

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—196455

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 31/08
B 01 D 15/08
G 01 N 31/08

識別記号
1 2 7
1 3 7

庁内整理番号
6514—2G
7430—4D
6514—2G

⑬ 公開 昭和58年(1983)11月15日
発明の数 2
審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑭ 液体クロマトグラフィー系に用いる装置および前置カラム

⑯ 特 願 昭58—74233

⑰ 出 願 昭58(1983)4月28日

優先権主張 ⑱ 1982年4月28日 ⑲ オランダ
(NL) ⑳ 8201757

㉑ 発 明 者 ヘンリ・エム・ルイテン
オランダ国ウエースプ・セー・
イエー・ファン・ハウテンラー
ン36

㉒ 発 明 者 ハンス・ドウ・ブリー
オランダ国ウエースプ・セー・
イエー・ファン・ハウテンラー

ン36

㉓ 発 明 者 ペーター・ハー・ファン・アム
ステルダム
オランダ国ウエースプ・セー・
イエー・ファン・ハウテンラー
ン36

㉔ 出 願 人 デュフアル・インテルナチオナ
ル・レセールフ・ペー・ヴェー
オランダ国ウエースプ・セー・
イエー・ファン・ハウテンラー
ン36

㉕ 代 理 人 弁理士 杉村暁秀 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称 液体クロマトグラフィー系に
用いる装置および前置カラム

2. 特許請求の範囲

1. (1) 1個以上の前置カラムと、(2) 1
個以上の前置カラムおよび液体用送込管を1
個以上の分離カラムおよび廃液用排出管に連
結するための部材と、(3) 簡意に1個以上の
分離カラムとを備えた液体クロマトグラフ
ィー系に用いる装置において、該装置が、相
互に封止連結状態にあり相互に回転可能であ
る2個の同心円板から成る連結部材を備え、
該円板の一方が1個以上の前置カラムと液体
用送込管を封止連結させることのできる開口
を有し、もう一方の円板が1個以上の分離カ
ラムと廃液用排出管を封止連結させることので
きる開口を有し、2個の円板における上記
開口を一方の円板をもう一方に対して回転さ
せることにより相互に隨意に連通するように
したことを特徴とする液体クロマトグラフィ

ー系に用いる装置。

2. クロマトグラフィーすべき物質を高圧で予
備濃縮するための耐圧力材料の前置カラムに
おいて、該カラムが内部で両端に向かって狭
くなり且つ予備濃縮すべき液体用送込管と該
カラムの上流で並びに分離カラムと該カラム
の下流で封止連結するための手段を備えた容
器形状本体から成ることを特徴とする前置カ
ラム。

3. 上記容器形状本体の内壁が円錐状にまたは
一体的に該本体の両端に向かって収束した特
許請求の範囲第2項記載の前置カラム。

4. 上記連結手段が容器形状本体の両端で相互
に相対して存在する特許請求の範囲第2また
は3項記載の前置カラム。

5. 上記容器形状本体の内壁がその下流端部方
向よりも上流端部方向に一層急激に狭くなる
特許請求の範囲第2～4項いずれか一つの項
記載の前置カラム。

6. 上記容器形状本体の下流口の径が、該前置

カラムと連結すべき分離カラムの径とほぼ等しい特許請求の範囲第2～5項いずれか一つの項記載の前置カラム。

7. 上記容器形状本体が耐圧方式で相互に連結される2個以上のセグメントから成る特許請求の範囲第2～6項いずれか一つの項記載の前置カラム。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、クロマトグラフィーすべき物質を高圧で予備濃縮するための耐圧力材料の前置カラムに関するものである。更に、本発明は液体クロマトグラフィー系に用いる装置および該装置用連結部材に関するものである。

液体クロマトグラフィーは、微量分析 (tracing) について液体に溶解し又は分散している物質の同定および濃度決定用に、並びに液体からのかかる物質の分取スケールでの分離用に頻繁に用いられる分離技術である。前者の場合は分析液体クロマトグラフィーであり、後者の場合は分取液体クロマトグラフィーである。液体クロマトグラフ

フィー (LC)、特に所謂「ハイ・パフォーマンス液体クロマトグラフィー」(HPLC) は液-固クロマトグラフィー (LSC)、分配クロマトグラフィー、例えば液-液クロマトグラフィー (LLC) およびバウンディッド-フェイズクロマトグラフィー (bounded-phase chromatography) (BPC)、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー (affinity chromatography)、並びにイクスクルージョンクロマトグラフィー (exclusion chromatography) 例えばゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) およびゲル濾過クロマトグラフィーに分けることができる。

これらクロマトグラフィー技術の殆どは、通常粒状の担体材料で満たされる1個以上のカラムが使用される。担体材料の選択はクロマトグラフィーすべき物質、上記物質が存在する液体およびクロマトグラフィー処理に使用される溶媒に左右される。従って、使用すべき溶媒および担体は解決しようとする分離問題によって決定される。

- 3 -

分離又は検出しようとする物質が液中に極少量、即ち著しく低濃度で存在する場合には、予備濃縮を用いるのが一般的である。この場合、実際のクロマトグラフィーカラムまたは分離カラムの前に連結することのできる予備濃縮カラム又は前置カラムがしばしば使用される。液体クロマトグラフィーに使用すべきかかる前置カラム (濃縮カラム) は米国特許第 4070284号明細書に開示されている。かかる明細書に披歴されている円筒形カラムは直径 0.4インチ、長さ 0.6インチの最大寸法および高々 3 MPa の耐圧性を有する。然し、かかるカラムは前述の目的の殆どに、例えば HPLC を使用して、体液内の薬物および/または代謝物質を予備濃縮するのに適していない。この理由は捕集容量および分解能が共に極めて小さいことによる。予備濃縮処理中容易に高い圧力増加を明らかに回避するために、上記特許発明に推奨されるような比較的大きな粒径のものを充填したカラムを使用しても尚分解能に悪影響を及ぼす。HPLC 技術に前置カラムを使用することは、例えば

- 4 -

J. Chrom. 222, (1981), pp. 13-22 においてロート (Roth) 等によって述べられている。この文献は体液内の薬物または代謝物質の微量分析に関するものである。これら体液内の微量成分の濃度は極めて小さく、例えば 1 ng/ml 当りナノグラムのオーダーであるので、予備濃縮が必要である。ロート等が用いた前置カラムは、目的とする用途に適した担体を乾燥状態で満たした長さ 25 mm のまっすぐなカラムである。このカラムに試験すべき体液試料が供給され、検出すべき微量成分が担体材料に吸着される。ついで微量成分が、この目的のために選ばれた溶媒により前置カラムまたは分離カラムから洗脱される。クロマトグラフィーカラムまたは分離カラムは微量成分を種々の成分に分離するのに適する担体材料で満たされる。分離カラムの溶離により、各成分を多少純粋な状態で捕集し、検出することができる。

然し、例えば上記文献においてロート等によって述べられているようなまっすぐな前置カラムを用いた場合に、前置カラムに吸着された物質を 1

- 5 -

- 280 -

- 6 -

個以上の分離カラムにより種々の成分に実際に分離することが阻害されることが分かった。実際のところ、引き続いて行なわれる溶離において阻害因子として目詰りおよびゴーストイフェクト (ghost effect) が生じ、同時に分解能が通常悪くなる。また、特に一層大きな容量をクロマトグラフィーする際に同様の現象が生ずることが J. Chrom. 136, (1977), 65においてシャオベーカー (Schaubecker) 等によって確認された。

然し現在上記問題は、内部が両端に肉につれ狭くなり且つ予備濃縮すべき送込管と上流で、分離カラムと下流で封止連結するための手段を有する容器形状本体から成る予備濃縮用前置カラムを使用する場合に生じないことが分かっている。かかる前置カラムを使用する場合、クロマトグラフィーカラムにおける次の分離で妨害ゴーストイフェクトおよび不十分な分解能が生じないようにして、体液内に存在する代謝物質等の微量成分を予備濃縮することが可能であることが証明された。

本発明の前置カラムでは尿、胆汁液、唾液およ

び血漿の如き種々の体液のみならず臓器の均等質および質の予備濃縮を行なうことができる。この結果、かかる液体および排出物中の薬物および代謝物質の微量成分を検出し決定し更にこれらを分離することも可能となる。然し、本発明の前置カラムは薬学上または臨床上の使用に意図されるだけでなく、微量分析を行なわなければならない他のすべての液体に使用でき、例えば廃水、飲料水、雨水、地下水および地表水の定量的および定性分析に、並びに代謝物質および農作物、汚物、地下水および地表水に含まれる例えば殺虫剤の検出、決定および分離に使用することができる。

理論的考察に基づいて、セッド (J. High Res. Chrom. Commun. Feb. 1979, pp. 63-67) はクロマトグラフィーカラムまたは分離カラムに関しては円錐形状の方が段階構成 (複合) 形状 (step-wise composed (composite) shape) よりも好ましいとの認識に至った。然し、他に分離問題に関係し予備濃縮には関係しないこの理論的考察は如何なる実施例によっても具体化

- 7 -

されていない。更に、この大きさのクロマトグラフィーカラムはそれ自体予備濃縮カラムに使用することができない。この理由はかかる大きさがカラムを展開する目的によりなかならず決定されるからである。またこのことも、1m の長さに巨り直径が3cmから1cmに円錐状に変化するセッドにより考え出された分離カラムの理論的に好ましいモデルにより明らかとなる。かかる寸法は前置カラムには過ぎない。実際のところ、前置カラムの容量は効果的予備濃縮のために大き過ぎてはならない。更に、分離中溶離液中の微量成分の濃度は小さくなり過ぎて正確な検出および測定をすることができない。従って、前置カラムの長さは約10cm未満であるのが好ましいが、入口と出口は十分に広くしてカラムに形成される著しく高い圧力を回避しなければならない。更に本発明の前置カラムは高圧で予備濃縮するのに役立つ。即ち、かかる前置カラムはこの用途に対して一般的である100 KPaと10MPa間の圧力で使用しなければならない。セッドの考えではかかる圧力は考慮されて

- 8 -

いない。分離処理中、従って前置カラムが分離カラムに連結されている場合に前置カラム内の圧力は約40MPaまで上昇することさえあり得る。カラムを設計する際、かかる高圧力を考慮しなければならないことは疑う余地がない。従って、カラムの形状は、溶離中に生ずる前述の現象を回避し乍らクロマトグラフィーすべき物質を予備濃縮することができるだけでなく、更に約40MPaまでの圧力に耐えることができるようにしなければならない。

本発明の前置カラムは、カラムを必要とする前述のクロマトグラフィー分離処理、例えば液-液クロマトグラフィー (LLC)、液-固クロマトグラフィー (LSC)、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) の如何なる場合にも使用することができる。

好適例において本発明の前置カラムは、容器形状本体の内壁が円錐状にまたは一体的にかかる本

- 9 -

- 281 -

- 10 -

体の両端に向って収束するような形状を有する。上流の予備凝結すべき送込管と下流の分離カラムとの連結手段は容器形状本体の両端で相互に相対して存在するのが好ましい。これら連結は少なくとも40MPaの圧力に耐え得るねじ連結または緊締結合とすることができる。他の好適例においては、容器形状本体の内壁がその下流端部方向よりも上流端部方向に一層急激に狭くなる。この結果、ある最大直径が供給液体に対してすぐに達成され、一方最大カラム直径を下流口直径に減ずることが極めて簡単である。他の利点は、容器形状本体の下流口の径が前置カラムに連結すべき分離カラムの径とほぼ等しいので、クロマトグラフィー分離処理中に前置カラムを分離カラムに連結する場合に所謂「磨滅」パターンの乱れが最少限となる。

カラムを好ましくはステンレス鋼から製造し、これを一体的に形成することができるが、耐圧方式で相互に固定される2個以上のセグメントから構成することもできる。適当なる連結は、例えばセグメント外側にフランジを設け締付環または締

付バンドによりあるいは該フランジを貫通するねじボルトによりフランジを相互に締付けることによって得ることができる。所要に応じて、良好なる耐圧封止を適当な材料のガスケットにより達成することができる。製造技術の観点から、数個のセグメントから成る前置カラムは一体的に形成されるカラム以上の利点を有する；これは特に径の大きなカラムに適用される。前述の如く、前置カラムは少なくとも40MPaの圧力に耐えることができなければならない。この耐圧は、カラムを数個のセグメントから構成することにより更に容易に達成することができる。

前置カラムを使用する前に、このカラムに適当な担体材料または吸着剤を充填する。体液のHPLC試験に関しては、例えば撥水処理(hydrophobated)して撥水剤(water-repellent)となるシリカゲルの如き前処理したシリカゲルが適当である。他の用途に関しては、液体クロマトグラフィー技術に有用である他の担体材料、例えば酸化アルミニウムまたはイオン交

- 11 -

換樹脂も使用することができる。カラムに担体材料を乾燥状態で充填することができるが、或いはまた担体をスラリーとしてカラムに供給することもできる。カラムの先頭上流部分において、不活性充填剤を担体材料に供給するのが好ましい。撥水処理したシリカゲルを担体材料として使用する場合に、ガラス玉またはシリカゲルを不活性充填剤として使用することができる。不活性充填剤を使用することにより、前置カラムに供給されたクロマトグラフィーすべき物質がカラム全体に亘り一層均一に分布することが達成される。また、かかる充填はデ・ヨング(de Jong)等(J. Chrom., 148 (1978), pp. 127-141)により提案されている。担体材料は、例えばカラム内の焼結金属の2個のフィルター間に収納されるのが好ましい。前置カラムの通常のコンディショニングを行なった後、試験すべき液体試料を、連結シリンジを有する管により或いは大きな容積に関する場合にはポンプによりカラムに加える。吸着された成分は担体上に残存し、一方未吸着物質は

- 12 -

液によりカラムを介して流出する：かかる廃液は排出管を介してカラムから流出する。ついで前置カラムをその下流において分離カラムまたはクロマトグラフィーカラムに連結する。尚このカラムは通常法でコンディショニングする。ついで吸着物質を適当な溶媒または溶媒混合液により分離カラムに溶離させ、然る後分離カラムを好ましくは同じ溶媒または溶媒混合液で溶離する。一定組成の溶離液の代りに、組成を連続的に変化させる溶媒混合液をしばしば使用する(傾斜溶離法)。また、連続的傾斜溶離法に加え、段階的傾斜溶離法を用いることもできる。クロマトグラフィー処理に要求される圧力は、1個以上のポンプを使用することにより得られる。更に、液体クロマトグラフは通常の制御装置、自動画分コレクターおよび試験すべき成分を検出するのに適した検出器を備える。

上述の如き液体クロマトグラフィー装置を使用する場合に、必然的に連結の頻繁な切り換えを伴う。実際、先ず前置カラムをコンディショニン

- 13 -

- 282 -

- 14 -

グし、ついでクロマトグラフィーすべき液体で処理しなければならない。カラムをコンディショニングするのに必要な溶液と、担体への吸着により脱離成分が除去された廃液とをカラムから流出させなければならない。従って、下流端部で排出管と連結できることが必要である。ついで実際の分離処理（溶離）に関して、前置カラムをその下流端部で分離カラムと連結しなければならない。コンディショニングを可能にするために、分離カラムにも液体用送込管と上流で連結するための装置を設ける。種々の目的、例えば多くの液体試料の同時クロマトグラフィー処理、カラム溶離液の繰返し予備濃縮またはより一層高度の純度を得ることを目的とするクロマトグラフィー処理の繰返しに対し、数個の前置カラムを随意に数個の分離カラムに連結するのが更に一層好ましい。

従って、また本発明は、簡単な方法で1個以上の前置カラムを廃液用排出管または1個以上の分離カラムに随意に連結することを可能にする連結装置に関するものである。かかる目的のために、

- 15 -

え、1個以上の分離カラムおよび廃液用排出管との封止連結用開口をもう一方の同心円板に備え、2個の円板における上記開口を、一方の円板をもう一方に対して回転させることにより相互に随意に連通させることができる。

好ましくはステンレス鋼で造る連結部材の円板は、例えばテフロンガスケットにより封止状態で相互に連結する。断面が円形であり且つ円板に設けた円周溝に取り付けられるガスケットを使用することにより、円板を相互に回転させることができる。この連結部材は約40MPaまでの圧力に耐えることができる。また所望に応じて、円板における開口への連結は、好ましくはステンレス鋼およびテフロン封止で行なう。

前置カラム、分離カラム、送込管および排出管を円板に設けた開口に連結させることができるようにするために、例えばねじ連結または緊締結合の形態による連結手段がある。他の適当なる連結部材は中心孔を有するインサートにより形成され、かかるインサートはこれに連結される送込管また

(1) 1個以上の前置カラムと、(2) 1個以上の前置カラムおよび液体用送込管を1個以上の分離カラムおよび廃液用排出管に連結するため部材と、(3) 所要に応じて1個以上の分離カラムを備える液体クロマトグラフィー系に用いる装置を開発した。かかる前置カラムは前述のタイプのものでよい。

また、液体クロマトグラフィー系に用いる装置は前述の米国特許第 4,070,284号明細書に開示されている。かかる明細書に示されている装置は、前置カラムを分離カラムに連結するための若干の多方弁(multi-way valves)を備えている。然し、これらの多方弁は数メガパスカールよりも高い圧力に耐えられない。

本発明の特別な面として、上記装置に関して少なくとも20MPaの耐圧性を有する連結部材を開発した。本発明の連結部材は、相互に封止連結状態にありお互いが回転可能である2個の同心円板から成り、1個以上の前置カラムおよび液体用送込管との封止連結用開口を該同心円板の一方に備

- 16 -

は排出管用カラムまたはニップルと円板の一方に設けた開口において封止状態で嵌合し、該インサートは、円板に設けた開口により形成されたショルダーと掛合するフランジをその外面に備える。インサートの中心孔はその外側で、例えば溶接またはねじ連結によりインサートに連結されるカラムまたはニップルと連通し、その内側で円板における細くした孔と連通する。インサートにおける中心孔の径はカラムまたはニップルの内径とほぼ等しいのが好ましい。同じ外径および外部形状のインサートを有するカラムを使用することにより、任意カラムを、連結部材の円板の一方に設けた関連開口に迅速に随意に連結させることができる。円板を互に手動でまたは自動的に容易に回転できるようにするため、一方の円板を、例えばこの円板に連結した取手をスタンドで締付けることにより固定でき、一方、もう一方の円板に補助装置を設けて所望回転を達成する。後者の円板の手動操作に関しては、取手または取手に関する連結装置を外側縁部に設けるのが好ましい。更に円板は、

- 17 -

- 283 -

- 18 -

ロック装置、例えばアバットメントピンまたはプレート、ミルド鋼におけるアバットメントピン、あるいは円板における開口が相互に連結する場所を固定する固定用キャッチまたはねじを備える。

次に本発明を図面により説明する。

第1図に縦断面図として示す前置カラムは1個の組立体から成り、ステンレス鋼で製造する。円筒状中央部1は両端方向に円錐状に収束し、部分2は下流端部5に向う部分4よりも一層急激に上流端部3方向に収束する。上流端部3は、外部ねじ山を有するニップルを螺合できる内部ねじ山を有する。クロマトグラフィーすべき液体用送込管を前記ニップルに連結させることができる。下流端部は、例えば第6図に示す如く前置カラムを連結部材に螺合することのできるねじ山を外側に有して、且つガスケット用マウントを形成する突設周辺縁部または懐6を有する。

第2〜3図は、2個の部分、即ち夫々容器形状部70と54および夫々カバー48と55から成る本発明の前置カラムの断面図である。第2図に示す前置

カラムのカバーは送込管と連結できるニップル71を有しており、液体を該ニップルを通りついで中央内腔72を通過してカラム内部に到達させることができる。カバーは容器形状部と螺合できる外部ねじ山73を有し、該容器形状部はそのマウント76に嵌合するガスケット75に至るまで内部ねじ山74を有する。銑結金属50のフィルターを取り付けたガスケット75を図面では拡大して示す。下流端部における容器形状部70はガスケット用マウントを形成する外部周辺縁77を有し、且つ例えば第7〜8図に示す如くカラムを連結部材に螺合できるねじ山78を有する。

第3図に示す2部分に分かれたカラムの夫々の部分を、カバーの凹所79と79aおよび容器形状部のタッパ形状口80と80aを通してボルトにより該部分の一方を他方の頂部に螺合させることができる。ガスケット81と82は夫々カバーと容器形状部に設けた周辺溝83と84に掛合し、一方フィルターホルダ85に存在する1個または複数のフィルターはガスケット間の1か所または複数のか所で相

- 19 -

持させる。カバーは容器形状部の外側端部に近接する周辺縁部86を有する。内部にねじ山を有する、送込管と連結するためのニップル用連結口80がカバー55に存在する。カラムは内部が両端に向うにつれ上流方向は75°の角度で、下流方向は27°の角度で狭くなる。最終的に、下流端部におけるカラムの容器形状部は外側に周辺縁87とねじ山88を有する。

第4図は、前置カラムと96で連結させることができる液体クロマトグラフィー系に用いる該装置の連結部材の平面図である。第4図の夫々V-V線およびVI-VI線に沿って切断した同じ装置の断面図に示す第5図および第6図に明らかに見られるように、連結部材はやはりステンレス鋼の同心円板7と8から成り、円板7は軸受けボス9のまわりを回転できる。円板は、ボルトの如く構成され円板7を介してねじ込まれる上配ボス9により互いに緊結させる。ほぼ環状断面を有するテフロン製の環状ガスケット(例えば10と11)は、2個の円板間の一方に設けた溝に存在する。環状ガスケット

- 20 -

は円板間に存在し、円板の孔の周囲に設ける(後述)。前置カラム用連結口9は、カラムを強化テフロン製の封止ガスケット12に至るまでかかる装置内に螺合させることができるように外部ねじ山を有する。連結口96はガスケットのもう一方の側において狭くなり、より一層小さな径を有する内腔を形成し、円板状の銑結金属90のフィルターが連結口と内腔の間に存在する。前置カラム用連結口を有する上配円板の縁部外側に取手13を備える。更にこの円板はコンディショニング液用送込管との連結に関与するニップル14を有する。コンディショニング液は、クロマトグラフィー処理前に分離カラムをコンディショニングするのに使用する。連結部材はもう一方の円板には取手15を2個のボルトにより連結し、かかる取手15を円板から離間するその端部16でスタンドに取り付けることができる。分離カラムとの連結に関する、中心に孔を有するインサート18は円板のマウント17に存在する。更に、この後者の円板は廃液用排出管との連結に関するニップル19を備える。更にまた

- 21 -

- 284 -

- 22 -

この円板はアバットメントプレートおよびピン20、21を備え、この結果、円板の連結口を相互に連通させるのに必要な円板相互間の回転距離を容易に決定することができる。

第7～8図に示す液体クロマトグラフィー系に用いる装置はシャフト23のまわりを回転可能な2個の同心ステンレス鋼円板から成る連結部材22を備え、かかるシャフトは円板の開口に嵌込まれた軸受けを両端で有する。前述の第4～6図の例と同じテフロンガスケットが存在する。上部円板24はボルト25により中央シャフト23のフランジ26に連結させる。この上部円板は底部円板に対して回転可能であり、従ってシャフトもまた回転する。上部円板に6個の開口を設け、(29、30および31で)前置カラムとあるいは32でインサート33と組合できるようにかかる開口におじ山を設ける。尚インサート33は中心孔を有し、ニップルを備えあるいはニップルと連結させることができる。すべての開口は、縮小した径の孔として内部に続く。また、開口34を底部円板に設け、この開口は、中

- 23 -

スタンドのロード状エレメント40に連結させる。プレートは密封状態で一方を他方に緊締させ、ここで環状テフロンガスケットを連結部の円板における場合のようにプレート間に設ける。下方プレート42をボルト44により軸受けシャフト23に固定し、これにより該下方プレートは連結部材23の上部円板24と一緒に回転する。両プレート41、42は、これらプレートに設けた孔と連結するニップル27、27aを備える。下方プレート42におけるニップルは、液体管により連結部材22の上部円板24におけるニップルまたは前置カラムと連結させることができる。上方プレート41におけるニップルは各種液体、例えばコンディショニング用液、クロマトグラフィーすべき試液、種々の溶媒液を含有する容器と連結させることができる。第7～8図に示す装置は自動クロマトグラフィー処理に極めて適している。この理由は、コンディショニング、分離すべき微量成分を有する前置カラムの充填および種々の溶媒を行なう際に送込管をはずす必要がないからである。任意所望液を、上部連結円板の

- 25 -

心孔を有しニップルまたは分離カラムと連結させることができるインサート35用マウントを形成する。円板におけるこのマウントは、第4～6図に関して記載したものと同一形状を有する。上部円板は、取手36により底部円板に対して回転させることができる。更に、底部円板28は上部円板24に対するロック装置を備え、かかる装置は上部円板の外側縁部に設けた開口に掛合する爪61を有する弾性アーム37から成る。これにより上部円板を底部円板に関する所定位置で固定させることができる。この固定は、ノブ38を有する爪をスプリングの作用に対抗して上部円板の外側縁部の開口から引き出すことにより解除することができる。

底部円板をその外側縁部でスタンド39に組合せる。尚このスタンドは中央シャフト23に平行して延在し相対して位置する2本のロード状エレメント40から成る。連結部材から上方に若干離れた所で2個の環状ステンレス鋼プレート41、42を中央シャフト23に連結し、これらプレートのうち上方のプレート41を連結バーまたはスポーク43により

- 24 -

単純な回転により前置カラムまたは分離カラムの一つに導入することができる。

第7～8図に示す装置では、本発明の3個のステンレス鋼前置カラムを連結部材22の上部円板24に組合せて設ける。上記円板の開口29に組合せる前置カラム45は第2図に示す如き型を有する。円板24の開口30および31に組合せるカラム46および47は第3図に示す如き型を有する。カラム45はねじ連結部および連結ニップルを有するカバー48を備える。担体材料はカラム内の焼結金属の2個のフィルター50と51の間に収納させる。カラムの上流端部側の円錐状部分において、不活性重点剤52がフィルター上に存在する。カラムは、上部連結円板24に設けた開口29の細長い孔62にテフロンガスケットにより封止状態で連結させる。カラム46はボルト56により相互に連結した2部分(54と55)から成る。カラム45におけるように、焼結金属57、58のフィルターがカラム46にも存在し、この際上部連結円板24との封止はテフロンガスケット59により形成する。カラムは下流端部で円板24

- 26 -

の開口63と連通する。

上記装置は種々の改良が可能であることは勿論である。例えば、連結部材の内板および環状プレートに設けた多数の開口を随意に変えることができ、種々の連結、例えばインサートまたはねじ連結に適するようにすることができる。また、当業者に明らかな他の多くの改良例を本発明の範囲から逸脱することなく行なうことが可能である。

本発明の前置カラムを使用する場合、先ず担体材料、例えば脱水処理したシリカゲル、例えばコラシル (Corasil)、ニュークレオシル (Nucleosil)、ゾルバックス (Zorbax) またはリクロプレブ (Lichroprep) をカラム内の焼結金属の2個のフィルター間に収納させる。不活性充填剤、この場合ガラス玉をカラムの上流端部側の円柱部内のフィルター上に設ける。この前置カラムを第5〜6図または第7〜8図に示す連結部材に連結する。第7〜8図に示す装置において本発明の前置カラムを多数使用する。更に該装置は、好ましくは同じタイプの担体材料で満たした

1個以上の分離カラムを有する。前置カラムおよび分離カラムをコンディショニングする場合は、コンディショニング用液をカラムに通して洗浄し、ついで廃液容器に捕集する。然る後前置カラムは、クロマトグラフィーすべき物質、例えば尿試料を排出管と連結したかかる前置カラムに流し込むことにより該試料を充填する。充填後前置カラムを分離カラムに連結し、然る後カラムを溶離させる。この溶離中、所謂傾斜溶離法を用いるのが好ましい。この方法を用いることは、溶離処理中溶離液の組成を変化させることである。溶離速度、即ち溶離液がカラムの中を圧送される速度は前置カラムおよび分離カラムの直径、クロマトグラフィーすべき物質、担体材料並びに溶離液に左右される。溶離は室温で行なうのが好ましく、溶離中カラムおよび連結装置内の圧力は20〜30MPa、あるいは40MPaまでも増大させることができる。微量成分の検出は種々の方法で行なうことができ、例えばUV-分光分析の如き分光学的方法により行なうことができる。然し殆どの場合、溶出液に極

- 27 -

めて多くの発色性「不純物」が存在するのでUV-分光分析を好まず用いることはできない。従って、放射能測定を用いるのが好ましい。この場合、代謝物質試験において試験すべき化合物、通常薬物に、例えば放射性ラベル付き炭素または水素 (^{14}C または ^3H) で放射性ラベル付けをする。放射した放射能を測定することにより、化合物自体とラベル付けたフラグメントから成り得る代謝物質の両者を検出することができる。この検出は溶出液における「オン-ライン」または、即ち捕集した溶出フラクションにおける「オフ-ライン」で行なうことができる。前者の方法は後者よりも迅速に行うことができる。通常、後者の「オフ-ライン」検出法ではより正確な結果を得ることができる。

尿に含まれるイソックスブリン (Isosuprine) および代謝物質を検出し得るために、200mgの尿を上記クロマトグラフィー処理に供した。イソックスブリン、即ちp-ヒドロキイ-α-(1-(1-メチル-2-フェノキ

- 28 -

シエチル) アミノ) エチル) ベンジルアルコールは血管拡張活性を有する。この薬物または代謝物質はクロマトグラフィーすべき試料の極微量で即ち全体量で数マイクログラムで存在する。予備試験に關し、容量27mlの第3図に示す如き型の本発明のステンレス鋼カラムを使用した。前置カラム用充填剤として、ニュークレオシル30C8、脱水処理したシリカゲルを使用した。分離カラムは内径9mm、長さ50cmを有し、ゾルバックス7C8および脱水処理したシリカゲルを充填した。イソックスブリンに ^3H でラベル付けをした。水とメタノールの混合液で、メタノール含量を0から100%まで増加させて傾斜溶離を行なった。溶離速度は1分当り約5mlとした。微量成分をオフ-ラインで検出し、第9図に示すクロマトグラムを得た。このクロマトグラムでは、1分当りのカウント数で測定した放射能RAを時間に対してプロットした。Jによりクロマトグラムに示されるピークはイソックスブリンであり、その他ピークはイソックスブリンの代謝物質を示す。

- 29 -

- 286 -

- 30 -

比較のため、上記実験を本発明の前置カラムではなく、この目的に対して一般的であるまっすぐな前置カラムで繰返し行なった。まっすぐな前置カラムは内径が一定で9mm、長さ15cmを有する。実際にはこれ以上長いカラムを使用できなかった。この理由は、かかるカラムを使用した場合に充填中にカラムに加わる圧力が大きくなり過ぎてしまうからである。更に実験を、本発明の前置カラムに対して示したものと同一装置、同一タイプの物質、同じ反応条件で行なった。得られたクロマトグラムを第10図に示す。このクロマトグラムから、所謂「ゴースト・イフェクト」がGEで生じていることは明らかである。

また本発明の前置カラムを、第11、12、13および14図に示すクロマトグラムから明らかなように種々の他の分離問題を解決するのに使用した。第4～6図に示す如き単一連結装置かまたは第7～8図に示す如き6連式装置を用いた。

第11～12図に示すクロマトグラムは、(2-(4-(3-トリフルオロメチルフェニル)-1-

-ピペラジニル)エチル)-尿素、反攻撃活性を有する化合物およびこれらの代謝物質から成る試料のカラムクロマトグラフィーにより得た。

第11図に示すクロマトグラムは、ニュークレオシル30C8を充填した容量1.5mlの第2図に示す如きステンレス鋼前置カラム、およびニュークレオシル7C8を充填した長さ500mm、内径9mmの分離カラムを用いて得た結果を示す。供給試料は犬の血しょう22mlとした。溶離法は、メタノール含有量を0から100%まで増大させる水とメタノールとの混合液での傾斜溶離法を用いた。化合物は ^{14}C でラベル付けして、この放射能RAをオフラインにおいて1分当りのカウント数で測定して検出を行なった。Tでのピークは活性化合物を、その他のピークは代謝物質を示す。

第12図に示すクロマトグラムは、ニュークレオシル7C8を充填した容量27mlの第3図に示す如きステンレス鋼前置カラム、および同じくニュークレオシル7C8を充填した長さ500mm、内径9mmのステンレス鋼分離カラムを用いて得た結果

- 3 1 -

を示す。供給試料は犬の尿620mlとした。溶離法は、メタノール含有量を0から100%まで増大させる水とメタノールとの混合液での傾斜溶離法を用いた。化合物は ^{14}C でラベル付けし、オンラインで検出を行なった。Tでのピークは活性化合物を、その他のピークは代謝物質を示す。メタノール%による溶離の傾斜プロフィールをGPにより示す。

第13図に、0.5ppbのDESを添加した尿試料のクロマトグラフィーにより得たクロマトグラムを示す。DES、即ちジエチルstilbestrolはエストロゲン(oestrogenic)活性を有する物質である。本発明のステンレス鋼前置カラムは容量13mlを有し、これにリクロブレンRP2、温水処理したシリカゲルを充填した。分離カラムは、ニュークレオシル7C8を充填した長さ250mm、内径9mmのステンレス鋼カラムを用いた。供給試料は尿50mlとした。溶離法は、メタノール含有量を0から100%まで増大させる水とメタノールとの混合液での傾斜溶離法を用いた。DESを ^3H

- 3 2 -

でラベル付けした。検出はオフラインで行ない、DでDESのピークを得た。

第14図のクロマトグラムは、極微量のN-(2,6-ジフルオロベンゾイル)-N'-(4-トリフルオロメチルフェニル)尿素およびこの代謝物質を含有するラットの尿試料のカラムクロマトグラフィーにより得た。この尿素化合物は農薬、園芸および森林における殺虫剤として使用することができる。ニュークレオシル30C8を充填した容量27mlの第3図に示す如きステンレス鋼前置カラム、およびソルバックス7C8を充填した長さ500mm、内径9mmのステンレス鋼性分離カラムを使用した。供給試料は尿121mlとした。溶離法は、メタノール含有量を0から100%まで増大させる水とメタノールとの混合液での傾斜溶離法を用いた。化合物は ^{14}C でラベル付けをした。オンライン法で検出したところ、Pで活性化合物のピークを示し、その値は代謝物質のピークを示した。メタノール%による溶離の傾斜プロフィールをGPにより示す。

- 3 3 -

- 287 -

- 3 4 -

4. 図面の簡単な説明

第1～3図は夫々本発明の前置カラムの断面図、

第4図は液体クロマトグラフィー系に用いる本発明の連結部材の平面図、

第5～6図は第4図に示す装置を夫々V-V線およびVI-VI線に沿って切断した断面図、

第7図は本発明の前置カラムおよび連結部材を有する液体クロマトグラフィー系に用いる装置の断面図、

第8図は第7図に示す装置の平面図、

第9～14図はクロマトグラフィーにより得た時間(分)と放射能(RA)との関係を示すクロマトグラムである。

- | | |
|----------------------|------------------|
| 1…円筒状中央部 | 2, 4…部分 |
| 3…上流端部 | 5…下流端部 |
| 6…軸 | 7, 8…同心円板 |
| 9…軸受けボス | |
| 10, 11, 12, 59…ガスケット | |
| 13, 36…取手 | 14, 71…ニップル |
| 17…マウント | 18, 33, 35…インサート |

- | | |
|--------------------------|----------------|
| 20, 21…ピン | 22…連結部材 |
| 23…シャフト | 24…上部ボルト |
| 25, 56…ボルト | 26…フランジ |
| 29, 30, 31…前置カラム用開口 | |
| 32…インサート用開口 | |
| 34, 63…開口 | 37…弾性アーム |
| 38…ノブ | 39…スタンド |
| 40…エレメント | |
| 41, 42…環状ステンレス鋼プレート | |
| 43…スポーク | 45, 46, 47…カラム |
| 48, 55…カバー | |
| 50, 51, 57, 58…焼結金属フィルター | |
| 52…不活性充填剤 | 54, 70…容器形状部 |
| 60…連結口 | 61…爪 |
| 62…細長い孔 | 72…中央内腔 |
| 73…外部ネジ山 | 74…内部ねじ山 |
| 77…外部周辺棟 | 78, 88…ねじ山 |
| 79, 79a…凹所 | 80, 80a…タップ形状口 |
| 83, 84…周辺溝 | 85…フィルターホルダ |
| 86…周辺縁部 | 87…周辺棟 |

- 3 5 -

- 3 6 -

96…前置カラム用連結口。

特許出願人 デュファル・
インテルナショナル・
レセールフ・ペー・ヴェー

代理人弁理士 杉 村 曉 秀

同 弁理士 杉 村 興 作

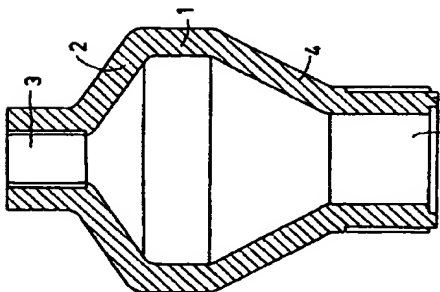


FIG. 1

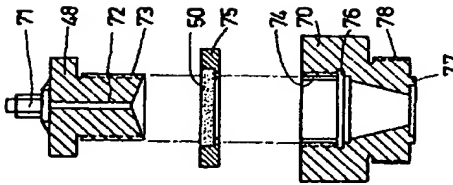


FIG. 2

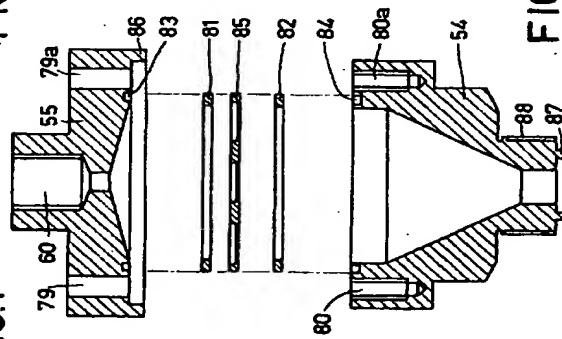


FIG. 3

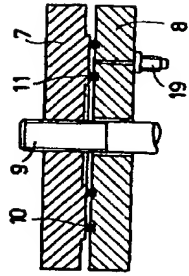


FIG. 4

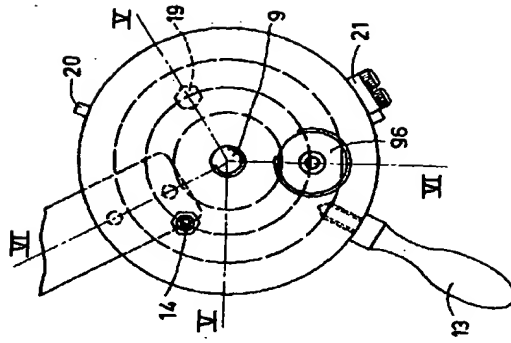


FIG. 5

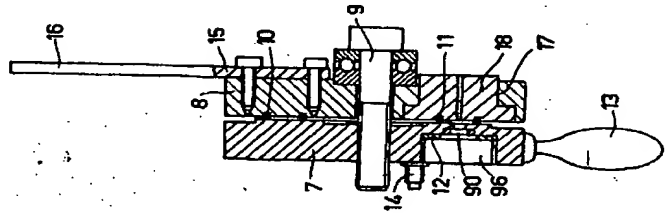
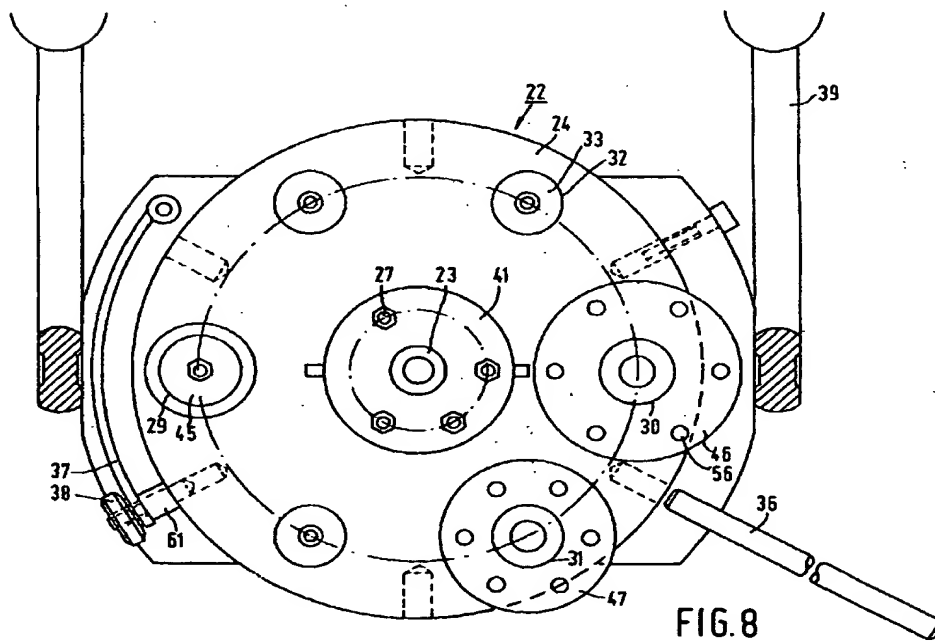
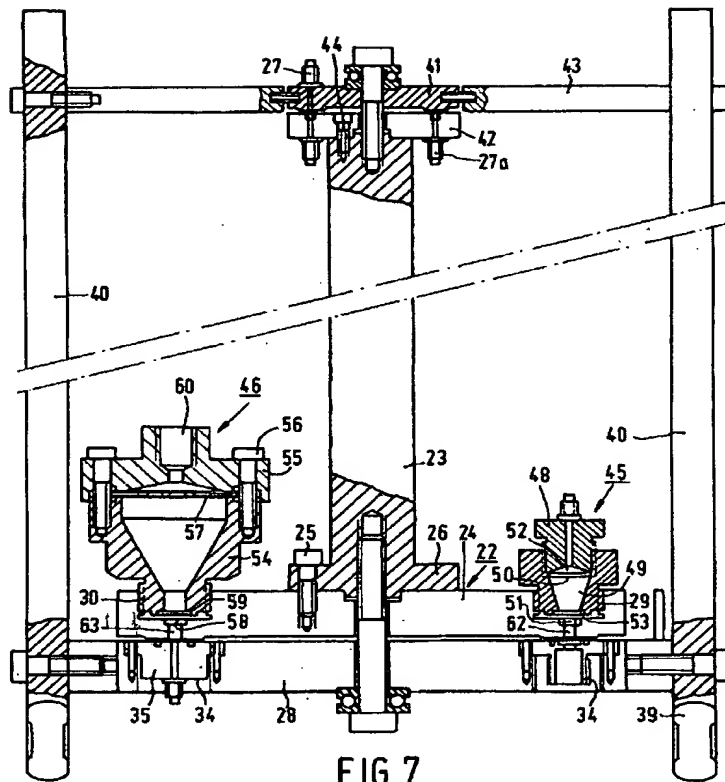


FIG. 6



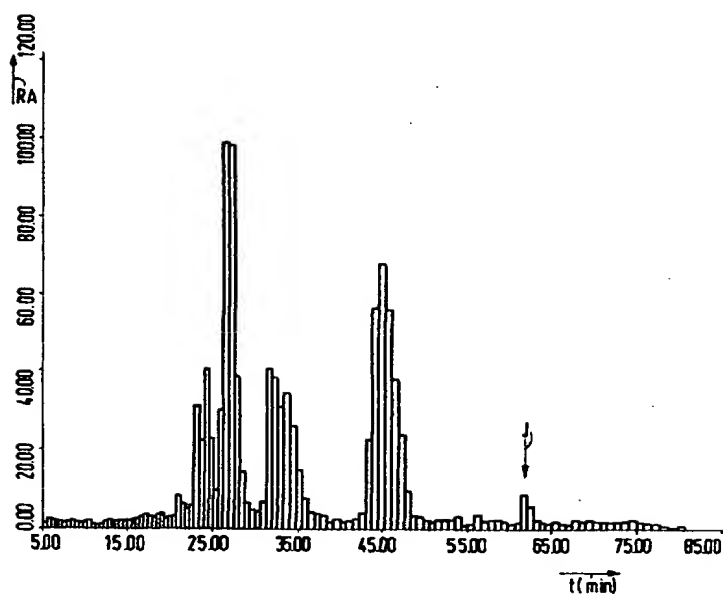


FIG. 9

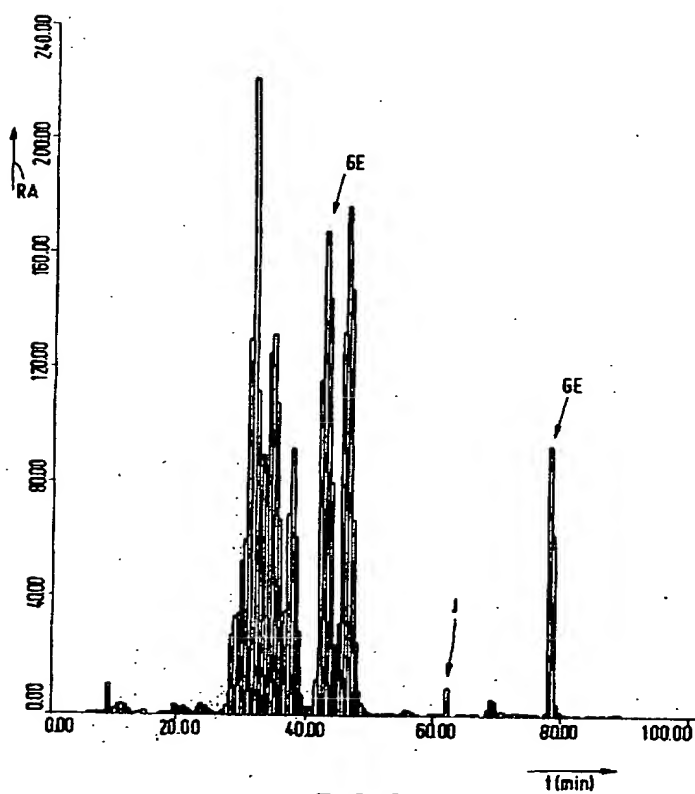


FIG. 10

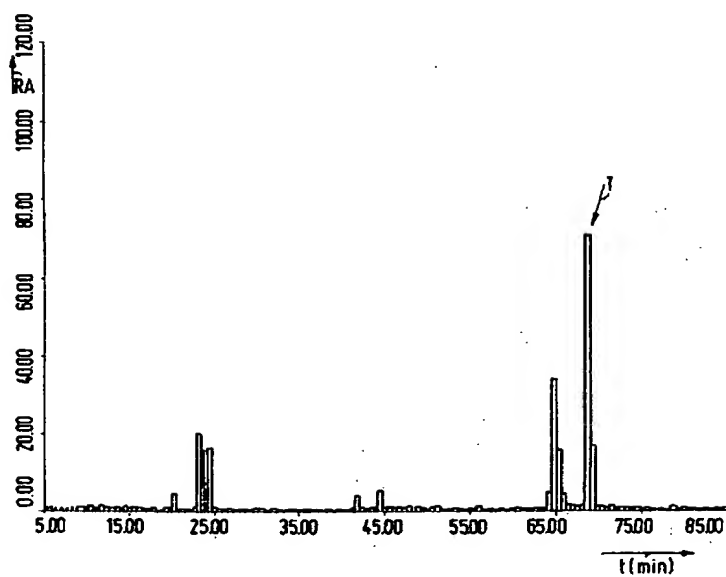


FIG.11

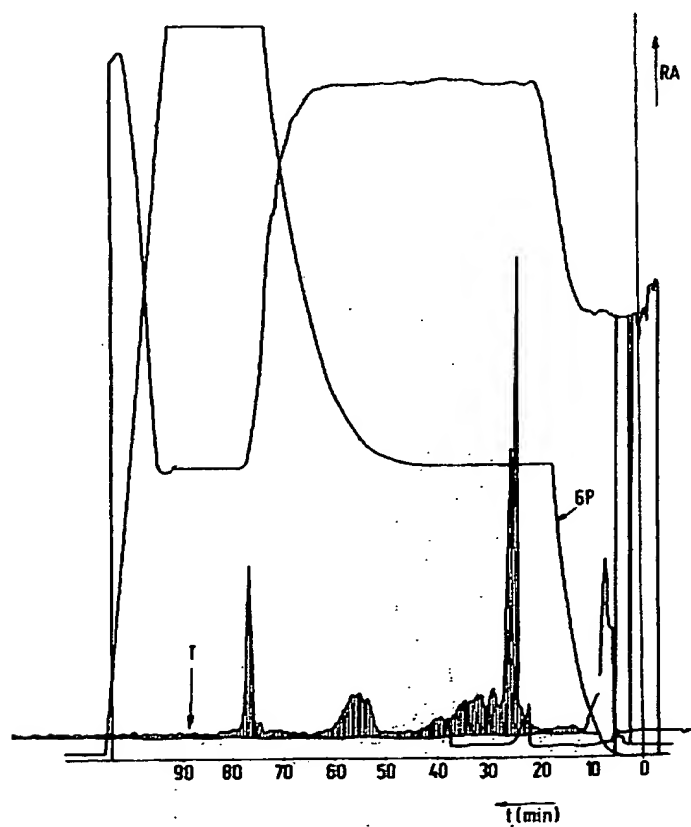


FIG.12

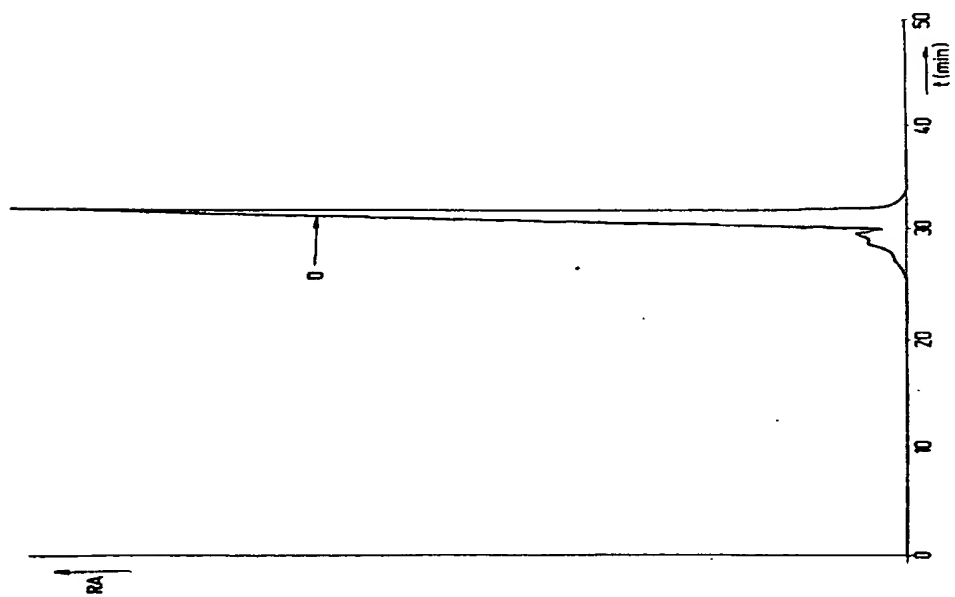


FIG.13

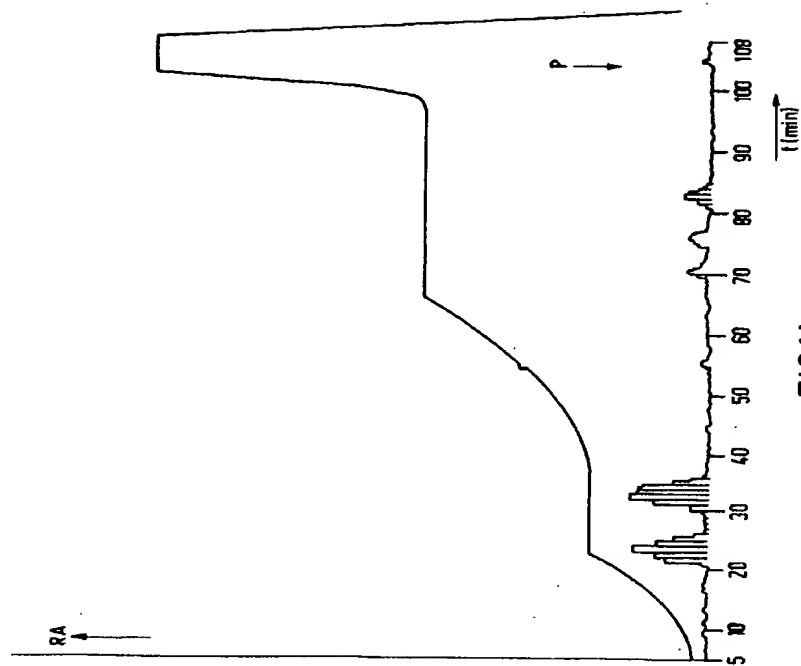


FIG.14

第1頁の続き

⑦発明者 エルベルト・ウイゲルス
オランダ国ウエースプ・セー・
イエー・ファン・ハウテンラー
ン36

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.